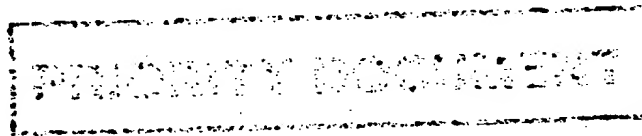


BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION



COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **04 MARS 1997**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

09/15/90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

1

a	<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE
DU RAPPORT DE RECHERCHE *

☐ OUI

☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI

☒ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

14 MAR 1996

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 03207 -

DATE DE DÉPÔT

14 MARS 1996

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

RHONE-POULENC RORER S.A.

Direction Brevets

20 Avenue Raymond Aron

92165 ANTONY CEDEX

Tel : (1) 40 91 61 23

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

EX 96002

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

(1) 40 91 72 36

7 TITRE DE L'INVENTION

MÉTHODE DE TRAITEMENT PAR THÉRAPIE GÉNÉRIQUE DES TUMEURS HUMAINES ET VIRUS
RECOMBINANTS CORRESPONDANTS

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY
LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

3 rue Michel Ange, 75016 PARIS
39 rue Camille Desmoulins, 94800 VILLEJUIF
1345 Avenue Of the Americas, 10105 NEW YORK

PAYS

FRANCE
FRANCE
ÉTATS-UNIS

10 NATIONALITÉ(S) FRANÇAISE
FRANÇAISE
AMÉRICAINE

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

☒ DE REVENDICATION (à partir de la 110)

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT* OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES*

☐ OUI

☒ NON

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE-N° D'INSCRIPTION

Par Procuration

LOBJOIS Françoise

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél.: (1) 42 94 52 52 - Télécopie: (1) 42 93 59 30 EX 96002

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9603207

TITRE DE L'INVENTION : METHODE DE TRAITEMENT PAR THERAPIE GENIQUE DES TUMEURS HUMAINES ET VIRUS RECOMBINANTS CORRESPONDANTS

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3 rue Michel Ange, 75016 PARIS, FRANCE
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY
39 rue Camille Desmoulins, 94800 VILLEJUIF, FRANCE
LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
1345 Avenue of the Americas, 10105 NEW YORK, ETATS-UNIS

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique):

BOON-FALLEUR Thierry - Rue du Buisson 12, 1050 BRUXELLES, BELGIQUE

DUFFOUR Marie-Thérèse, Rue Gay-Lussac, 75005 PARIS, FRANCE

HADDADA Hedi - 1 rue Jules Guesdes, 94140 ALFORTVILLE, FRANCE

LURQUIN Christophe - Rue Jules Adant 59, 1950 KRAAINEM, BELGIQUE

PERRICAUDET Michel - 31 rue de Chartres, 28200 ECROSNES, FRANCE

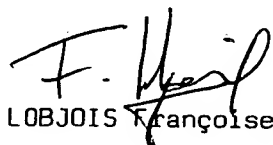
UYTTENHOVE-GHESQUIERE Catherine - Chemin de la Coquière 1, 1325 CHAUMONT-GISTOUX, BELGIQUE

WARNIER Guy - Hollekensweg 59, 16 30 LINKEBEEK, BELGIQUE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire **ANTONY**, le 14 Mars 1996

Par Procuration


LOBOISE Françoise

La présente invention concerne une méthode de traitement des tumeurs humaines par la thérapie génique. Elle concerne en particulier des virus recombinants défectifs portant une séquence codant pour un antigène spécifique des tumeurs humaines, et leur utilisation pour le traitement préventif ou curatif des tumeurs humaines ainsi que pour générer *in vitro* ou *ex vivo* des CTL spécifiques. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques comportant ces virus, notamment sous forme injectable.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie en introduisant une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information peut être introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite de l'organe et ensuite réinjectée dans l'organisme, soit *in vivo*, directement dans le tissu visé. S'agissant d'une molécule de haut poids moléculaire et de charge négative, l'ADN a des difficultés pour traverser spontanément les membranes cellulaires phospholipidiques. Différents vecteurs sont donc utilisés afin de permettre le transfert de gène : des vecteurs viraux d'une part, des vecteurs chimiques et/ou biochimiques, naturels ou synthétiques, d'autre part. Les vecteurs chimiques et/ou biochimiques sont par exemple des cations (phosphate de calcium, DEAE-dextran,...) qui agissent en formant des précipités avec l'ADN, lesquels peuvent être "phagocytés" par les cellules. Il peut également s'agir de liposomes dans lesquels l'ADN est incorporé et qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les vecteurs synthétiques de transfert de gènes sont généralement des lipides ou des polymères cationiques qui complexent l'ADN et forment avec lui une particule portant des charges positives en surface. Ces particules sont capables d'interagir avec les charges négatives de la membrane cellulaire, puis de franchir celle-ci. On peut citer comme exemples de tels vecteurs le dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS, TransfectamTM) ou le chlorure de N-[1-(2,3-diolexyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA, LipofectinTM). Des protéines chimères ont aussi été développées : elles sont constituées d'une partie polycationique qui condense l'ADN, liée à un ligand qui se fixe sur un récepteur membranaire et entraîne le complexe dans les cellules par endocytose. Il est ainsi théoriquement possible de "cibler" un tissu ou certaines populations cellulaires, afin d'améliorer la biodisponibilité *in vivo* du gène transféré (pour

revues, voir Behr, 1993, Cotten et Wagner, 1993). Parmi les virus potentiellement utilisables comme vecteurs pour le transfert de gènes on peut citer plus particulièrement les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc.), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus. Ces virus ont tous été
5 utilisés pour infecter différents types cellulaires.

Des approches de thérapie génique ont été développées pour le traitement de différents types de pathologies, incluant les désordres du système nerveux, les maladies cardiovasculaires ou les cancers. Concernant plus particulièrement le domaine des cancers, différentes approches ont été
10 proposées dans l'art antérieur. Ainsi, des études décrivent l'utilisation de lymphocytes activés ex vivo par culture en présence d'interleukine-2 ou par transfection avec le gène de l'interleukine-2. Des études d'immunothérapie adoptive ont également été entreprises avec des monocytes-macrophages purifiés et activés ex vivo par de l'interféron pour augmenter leur pouvoir
15 tumoricide, puis réinjectés aux patients (Andressen et al., Cancer Res. 50 (1990) 7450). La possibilité d'utiliser des macrophages génétiquement modifiés a également été décrite (WO95/06120). Une autre série d'approches est basée sur le transfert de gènes toxiques capables d'induire de manière directe ou indirecte la mort des cellules cancéreuses. Ce type
20 d'approche a été décrit par exemple avec le gène de la thymidine kinase, transféré in vivo soit par un vecteur adénoviral (PCT/FR94/01284; PCT/FR94/01285), soit par greffe de cellules productrices d'un vecteur rétroviral (Caruso et al., PNAS 90 (1993) 7024). D'autres gènes utilisés sont par exemple le gène de la cytosine désaminase.

25 Le présente demande est relative à une nouvelle méthode de traitement des cancers. Elle est tout particulièrement destinée au traitement des tumeurs humaines et notamment des mélanomes. La méthode de l'invention repose sur le transfert et l'expression in vivo d'antigènes spécifiques des tumeurs humaines comme les mélanomes, capables
30 d'induire (i) une protection immunitaire contre l'apparition de ce type de cancers et (ii) une expansion de la population de cellules T cytotoxiques (CTL) spécifiques des cellules présentant ces antigènes et ainsi une destruction par le système immunitaire des cellules tumorales correspondantes.

Le système immunitaire a entre autres fonctions la capacité d'assurer une protection contre les infections virales. Cette capacité est assurée par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les CTL présentent deux caractéristiques remarquables : ils sont hautement spécifiques et d'une grande efficacité. Ils détruisent les cellules infectées après avoir repéré un antigène viral à leur surface. L'antigène en question se manifeste sous la forme d'un peptide associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Dans le cadre des tumeurs, il a été observé, initialement chez la souris, que ces cellules malignes présentent des complexes peptide-molécules du CMH-I capables de provoquer, comme dans le cadre des réponses antivirales, une réponse immunitaire médiée par des CTL. Ces peptides proviennent notamment de protéines codées par des gènes mutés ou activés sélectivement dans les cellules tumorales. Ces protéines sont désignés antigènes spécifiques de tumeurs. Plus récemment, des antigènes de différenciation reconnus par des CTL ont été caractérisés sur des tumeurs humaines.

La présente invention concerne une nouvelle méthode de traitement des tumeurs humaines. Elle découle en particulier de la mise au point de vecteurs d'origine virale capables de transférer et d'exprimer in vivo des antigènes spécifiques de tumeurs humaines ou mélanomes. Elle repose plus particulièrement sur la démonstration dans les modèles murins que les adénovirus recombinants défectifs sont capables d'induire une immunisation contre ce type d'antigènes, permettant d'obtenir in vivo des réponses lymphocytaires contre ces antigènes et notamment les cellules tumorales les portant. Cette méthode selon l'invention permet donc par le transfert de ces gènes d'agir sur l'évolution des tumeurs humaines de manière particulièrement efficace en stoppant leur progression, pouvant conduire à l'éradication.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif contenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour une protéine ou un peptide spécifique de tumeur et plus particulièrement pour tout ou partie d'un antigène spécifique d'un mélanome.

Préférentiellement, il s'agit d'un antigène spécifique d'un mélanome humain. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'un fragment d'un antigène spécifique d'un mélanome humain comprenant la partie présentée aux CTL en association avec les molécules du CMH-I. Les antigènes spécifiques de tumeurs humaines ont été décrits par Thierry Boon et al. (US5,342,774; US5,405,940; WO92/20356; WO94/23031; WO94/21126). Ces antigènes, désignés sous le terme de MAGE, sont exprimés sélectivement dans les cellules tumorales, principalement les tumeurs humaines. Différents gènes MAGE humains ont été décrits, et notamment les gènes MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MAGE-7, MAGE-8, MAGE-9, MAGE-10, MAGE-11, MAGE-12. A titre représentatif de gènes murins homologues on peut également faire état des gènes S-MAGE-1 et S-MAGE-2. En ce qui concerne plus particulièrement des gènes BAGE, GAGE et RAGE, ils sont représentatifs d'autres familles de gènes apparentés.

Selon un mode préféré de mise en oeuvre, la présente invention concerne un adénovirus recombinant défectif contenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour une protéine ou peptide dérivant de celle-ci sélectionnée parmi les protéines Mage-1, Mage-3, Bage, Gage et Rage. Ces antigènes sont en effet les plus sélectifs, en ce sens qu'ils n'ont été détectés pour la plus grande majorité sur aucune cellule somatique non tumorale. La séquence de l'antigène mage-1 et du gène correspondant ont été décrites notamment dans Van der Bruggen et al., Science 254 (1991) 1644). La séquence de l'ADNc codant pour Mage-1 et Mage-3 a été décrite par exemple dans Gaugler et al. (J. Exp. Med. 179 (1994) 921).

Comme indiqué ci-avant, un mode de réalisation préféré de l'invention est représenté par un adénovirus recombinant défectif contenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour un peptide de la protéine Mage -1, Mage-3, Bage ou Gage comprenant la partie présentée aux CTL en association avec les molécules du CMH-I. Les gènes Mage, Bage et Gage codent en effet pour des protéines de taille importante. Ces protéines sont dégradées par digestion enzymatique dans la cellule, conduisant à la génération de peptides. Ce sont ces peptides qui sont alors présentés à la surface des cellules, et qui sont reconnus par les CTL en association avec les molécules du CMH-I (Cf figure 2). Encore plus

préférentiellement, l'invention concerne un adénovirus recombinant comprenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour un peptide de la protéine Mage-1 ou Mage-3 comprenant la partie présentée aux CTL.

5 Selon un mode de réalisation spécifique, l'invention concerne un adénovirus recombinant comprenant, inséré dans son génome, la séquence SEQ ID n° 1. Cette séquence comprend la séquence codant pour le nonapeptide (27pb) de Mage-1 qui est présenté par la molécule HLA.A1 aux lymphocytes T cytotoxiques. Encore plus préférentiellement, il s'agit de la
10 la séquence comprise entre les résidus 55 à 82 de la séquence SEQ ID n°1.

Selon un autre mode de réalisation spécifique, l'invention concerne un adénovirus recombinant comprenant, inséré dans son génome, la séquence SEQ ID n° 2. Cette séquence comprend la séquence codant pour le nonapeptide (27pb) de Mage-3 qui est présenté par la molécule HLA.A1
15 aux lymphocytes T cytotoxiques.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention concerne adénovirus recombinant comprenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour le peptide antigénique du gène P1A du mastocytome p815 de la souris DBA/2 (SEQ ID n° 3).

20 Comme indiqué précédemment, les adénovirus de l'invention permettent un transfert et une expression efficace de ces peptides antigéniques in vivo. Ainsi, ils permettent de manière tout à fait remarquable, de stimuler in vivo l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de ces antigènes, qui détruisent sélectivement toute cellule présentant à sa
25 surface cet antigène.

Les virus de l'invention sont donc utilisables pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement des cancers dont les cellules présentent des antigènes Mage à leur surface. Pour préparer de telles compositions, les cellules tumorales (généralement d'un mélanome)
30 d'un patient sont préférentiellement prélevées et analysées pour (i) déterminer l'expression d'un gène Mage par exemple, par RT-PCR. et (ii) le cas échéant, typer cet antigène Mage. Un adénovirus contenant un acide

nucléique codant pour tout ou partie de l'antigène correspondant est construit et utilisé pour l'administration.

Les virus de l'invention peuvent également être utilisés in vitro (ou ex vivo), pour générer des populations de cellules T cytotoxiques spécifiques d'un antigène tumoral donné. Pour cela, une population de cellules est infectée par un virus de l'invention, puis mise en contact avec des précurseur de cellules CTL. Les cellules CTL spécifiques des antigènes peuvent alors être sélectionnées in vitro, amplifiées, puis utilisées à titre de médicament pour détruire spécifiquement les tumeurs correspondantes. Avantageusement, la population de cellules infectée par un virus de l'invention comprend des cellules presentatrices d'antigènes (APC). Il peut s'agir en particulier de macrophages (WO95/06120) ou de cellules B.

Dans les adénovirus de l'invention, l'acide nucléique inséré peut être un fragment d'ADN complémentaire (ADNc), d'ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Comme indiqué ci-avant, il s'agit d'un acide nucléique codant pour tout une protéine ou peptide dérivant de cette protéine sélectionnée parmi Mage-1, Mage-3, Bage et Gage. Au sens de la présente invention, l'expression peptide dérivant de cette protéine signifie que l'acide nucléique peut coder pour un fragment seulement de la protéine, ce fragment devant être susceptible de générer des CTL. Le fragment selon l'invention porte donc au moins un déterminant antigénique reconnu par un CTL spécifique. Ces fragments peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par modifications génétique et/ou chimique et/ou enzymatique, ou encore par clonage par expression, permettant la sélection de variants en fonction de leur activité biologique. Les modifications génétiques incluent les suppressions, délétions, mutations, etc.

L'acide nucléique inséré est préférentiellement un ADNc ou d'un ADNg.

Généralement, l'acide nucléique inséré comprend également des séquences permettant l'expression dans la cellule infectée de l'antigène ou

du fragment d'antigène. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression dudit antigène lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente, désignées séquences hétérologues (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques).
 5 Notamment, il peut s'agir de promoteurs de gènes eucaryotes ou viraux ou de séquences dérivées, stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non et de façon inductible ou non. A titre d'exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on
 10 désire infecter, ou du génome d'un virus, et notamment, les promoteurs des gènes E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur CMV, LTR-RSV, SR α , etc. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut citer également les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine, α -actine, tubuline, etc), les promoteurs des filaments intermédiaires (desmine, neurofilaments, kératine, GFAP, etc) les
 15 promoteurs de gènes thérapeutiques (type MDR, CFTR, facteur VIII, etc) les promoteurs spécifiques de tissus (pyruvate kinase, villine, promoteur de la protéine intestinale de liaison des acides gras, promoteur de l'actine α des cellules du muscle lisse, promoteurs spécifiques pour le foie ; Apo AI, Apo AII, Albumine humaine etc) ou encore les promoteurs répondant à un
 20 stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc.). En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque l'acide nucléique inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

25 Les virus selon la présente invention sont défectifs, c'est-à-dire incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être
 30 soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène inséré. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Les virus selon l'invention peuvent être obtenus à partir de différents sérotypes d'adénovirus. Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et l'acide nucléique d'intérêt. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et l'acide nucléique (Cf FR94 13355). Avantageusement, la délétion dans la région E1 porte sur les nucléotides 454 à 3328 (fragment PvuII-BglII) ou 382 à 3446 (fragment HinfII-Sau3A). Avantageusement, la délétion dans la région E4 comprend au moins les phases ORF3 et ORF6.

L'acide nucléique d'intérêt peut être inséré en différentes régions du génome de l'adénovirus. Le génome d'un adénovirus est composé d'un ADN

double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Il comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes d'adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc.) ont également été séquencées. L'acide nucléique d'intérêt est préférentiellement inséré dans une région non essentielle à la production des virus recombinants défectifs. Ainsi, il est préférentiellement inséré au niveau de la région E1, qui est défective dans le virus et complétée par la lignée de production, de la région E3, qui n'est pas essentielle à la production des virus recombinants (son inactivation ne doit pas être transcomplétée), ou encore dans la région E4. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de compléter les fonctions E4 lors de la production, soit par co-transfection avec un plasmide ou virus helper, soit au moyen d'une lignée appropriée. Il est clair que d'autres sites peuvent être utilisés. En particulier, l'accès à la séquence nucléotidique du génome permet à l'homme du métier d'identifier des régions permettant d'insérer l'acide nucléique d'intérêt.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Généralement, les adénovirus sont produits par transfection de l'ADN du virus recombinant dans une lignée cellulaire d'encapsidation compétente. Il peut s'agir d'une transfection simple, lorsque l'on peut disposer d'une construction portant l'ensemble du génome du virus recombinant, ou, comme c'est le cas le plus souvent, d'une co-transfection de plusieurs fragments d'ADN apportant les différentes parties du génome viral recombinant. Dans ce cas, le procédé implique une ou plusieurs étapes de recombinaison homologue entre les différentes constructions dans la lignée cellulaire d'encapsidation, pour générer l'ADN du virus recombinant. Les différents fragments utilisés pour la production du virus peuvent être préparés de différentes façons. La technique la plus généralement utilisée consiste à

isoler l'ADN viral puis à le modifier in vitro par les méthodes classiques de biologie moléculaire (digestion, ligation, etc.). Les constructions obtenues sont ensuite purifiées et utilisées pour transfecter les lignées d'encapsidation. Une autre technique repose sur l'utilisation d'un plasmide portant une partie du génome du virus recombinant, qui est co-transfecté avec un virus apportant la partie manquante du génome. Une autre possibilité réside dans l'utilisation de plasmides procaryotes pour préparer les ADN viraux utilisables pour la transfection (Cf Bett et al., PNAS 91 (1994) 8802; FR95 01632).

10 La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire
15 humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

20 Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectif tel que décrit ci-avant. Les compositions pharmaceutiques de
25 l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, transdermique, intra-trachéale, intra-péritonéale, etc.

La présente invention concerne également toute composition
30 pharmaceutique comprenant des cellules infectées par un adénovirus recombinant défectif tel que décrit ci-avant. Avantageusement, la composition de l'invention comprend des cellules présentatrices d'antigènes (APC) infectées par un adénovirus recombinant défectif tel que décrit ci-avant. A titre d'exemple particulier, on peut citer les macrophages ou les

lymphocytes B. L'invention concerne encore une composition comprenant des cellules T cytotoxiques (CTL) spécifiques d'un antigène tumoral, préparées par culture de cellules précurseurs en présence de cellules présentatrices d'antigènes (APC) infectées par un adénovirus recombinant
5 défectif tel que décrit ci-avant.

Préférentiellement, une composition pharmaceutique de l'invention contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium
10 ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en
15 fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à
20 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

25 Selon l'antigène concerné, les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de cancers, incluant notamment les tumeurs humaines (pour les antigènes Mage-1 à Mage 12, Gage et Bage et Rage) les sarcomes (pour les antigènes Mage-1).

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des
30 exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5

Figure 2 : Expression et processing des antigènes mage

5 **Figure 3 :** Construction des plasmides pAd.SR α -MAGE.

Figure 4 : Protocole N°1 d'immunisation de souris DBA/2 par un ad-P1A ou contrôle.

Figure 5 : Protocole N°2 d'immunisation de souris DBA/2 par un ad-P1A ou contrôle.

10 **Tableau 1 :** Mise en évidence de la lyse spécifique par les CTL de cellules infectées par un Ad-Mage selon l'invention.

Tableau 2 : Mise en évidence de la capacité des cellules infectées par un Ad-Mage selon l'invention à stimuler la production de TNF par un clone CTL.

15 **Tableau 3 :** Mise en évidence de l'immunisation de souris DBA/2 par injection, selon le protocole 1, d'un Ad-P1A (tableau 3A) ou d'un adénovirus contrôle, Ad- β Gal (tableau 3B).

Tableau 4 : Mise en évidence de l'immunisation de souris DBA/2 par injection, selon le protocole 2, d'un Ad-P1A (tableau 4A) ou d'un adénovirus contrôle, Ad- β Gal (tableau 4B).

20

Techniques générales de clonage, de biologie moléculaire.

25 Les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium-bromure d'éthidium, les digestions par les enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, la transformation dans *E. coli*, la précipitation des acides nucléiques etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis *et al.*, 1989).

Les enzymes ont été fournies par New-England Biolabs (Beverly, MA).

30 Pour les ligatures les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille sur des gels d'agarose de 0,8 à 1,5 %, purifiés par GeneClean (BIO101, LaJolla CA) et incubés de nuit à 14°C dans un tampon Tris-HCl pH 7.4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en présence d'ADN ligase du phage T4.

L'amplification par PCR, (Polymerase Chain Reaction), a également été réalisée selon Maniatis *et al.*, 1989, avec les spécifications suivantes :

- Concentration en $MgCl_2$ portée à 8mM.
- Température de dénaturation 95°C, température d'hybridation 55°C,
- 5 température d'allongement 72°C. Ce cycle a été répété 25 fois dans un PE9600 Thermalcycler (Perkin Elmer, Norwalk CO).

Les oligonucléotides sont synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites protégés en β par un groupement cyanoéthyl, (Sinha *et al.*, 1984, Giles 1985), avec le synthétiseur automatique d'ADN Applied Biosystem modèle 394, (Applied Biosystem, Foster City CA), selon les recommandations du fabricant.

Le séquençage a été effectué sur des matrices double-brin par la méthode de terminaison de chaînes en utilisant des amorces fluorescentes. Nous avons utilisé le kit de séquençage Taq Dye Primer Kit de chez Applied Biosystem (Applied Biosystem, Foster City CA) selon les spécifications du fabricant.

20 **Exemple 1 : Construction d'un adénovirus recombinant défectif codant pour un fragment d'antigène P1A.**

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif selon l'invention codant pour un fragment de l'antigène P1A. Plus particulièrement, l'adénovirus porte la séquence SEQ ID n°3. L'adénovirus construit est un adénovirus de sérotype 5, possédant une délétion dans les régions E1 et E3, l'acide nucléique d'intérêt étant inséré dans la région E1, au niveau de la délétion.

L'acide nucléique inséré au niveau de la région E1 comprend plus particulièrement :

- le promoteur $SR\alpha$. Le promoteur $SR\alpha$ comprend l'origine de réplication précoce de SV40 et une partie du LTR du HTLV1 (correspondant au domaine R et à une partie de U5), suivis de la jonction d'épissage 16S de SV40 (Takebe *et al.*, Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 466).
- 35 - un minigène P1A de 44 pb (SEQ ID N° 3).

- le site de polyadénylation du virus SV40.

Cet acide nucléique a été extrait du plasmide pcD-SR α -P1A, correspondant au plasmide pcD-SR α dans lequel le minigène P1A a été cloné au site EcoRI. L'insert obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pAd.RSV- β Gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), à la place du fragment comportant le LTR de RSV et le gène LacZ.

Le plasmide pAd-SR α -P1A ainsi obtenu a ensuite été utilisé pour produire l'adénovirus recombinant. Pour cela, les cellules de la lignée 293 ont été co-transfectées par 5 μ g de plasmide pAd-SR α -P1A et par 5 μ g de l'ADN de l'adénovirus mutant dl 324 en présence de phosphate de calcium. Les adénovirus recombinants produits ont ensuite été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'analyse de l'ADN viral par digestion à l'aide d'enzymes de restriction EcoRI démontre la présence de l'insert dans le génome. L'adénovirus peut être conservé à - 80°C dans 10 % de glycérol.

Exemple 2 : Construction d'un adénovirus recombinant défectif codant pour un fragment d'antigène Mage-1.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif selon l'invention codant pour un fragment de l'antigène Mage-1. Plus particulièrement, l'adénovirus porte la séquence SEQ ID n°1 codant pour un fragment portant le nonapeptide antigénique de Mage-1. L'adénovirus construit est un adénovirus de sérotype 5, possédant une délétion dans les régions E1 et E3, l'acide nucléique d'intérêt étant inséré dans la région E1, au niveau de la délétion.

L'acide nucléique inséré au niveau de la région E1 comprend plus

particulièrement :

- le promoteur SR α . Le promoteur SR α comprend l'origine de réplication précoce de SV40 et une partie du LTR du HTLV1 (correspondant au domaine R et à une partie de U5), suivis de la jonction d'épissage 16S de SV40 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 466).

- un minigène MAGE-1 de 116 pb (SEQ ID N° 1). Ce fragment a été obtenu par PCR à partir du gène Mage-1 complet. Il comporte un ATG en position 15, un codon stop en position 121 et une partie de l'exon 3 du gène Mage-1. Il comprend la séquence correspondant au nonapeptide (27pb) qui est présenté par la molécule HLA.A1 aux lymphocytes T cytotoxiques (Cf figure 2).

- le site de polyadénylation du virus SV40.

Cet acide nucléique a été extrait du plasmide pcD-SR α -MAGE-1, correspondant au plasmide pcD-SR α dans lequel le minigène Mage-1 a été cloné au site EcoRI. L'insert obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pAd.RSV- β Gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), à la place du fragment comportant le LTR de RSV et le gène LacZ (Figure 3).

Le plasmide pAd-SR α -MAGE-1 ainsi obtenu a ensuite été utilisé pour produire l'adénovirus recombinant. Pour cela, les cellules de la lignée 293 ont été co-transfectées par le plasmide pAd-SR α -MAGE-1 et par l'ADN de l'adénovirus mutant dl 324 en présence de phosphate de calcium. Les adénovirus recombinants produits ont ensuite été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'analyse de l'ADN viral par digestion à l'aide d'enzymes de restriction EcoRI démontre la présence de l'insert dans le génome. L'adénovirus peut être conservé à - 80°C dans 10 % de glycérol.

Exemple 3 : Construction d'un adénovirus recombinant défectif codant pour un fragment d'antigène Mage-3.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif selon l'invention codant pour un fragment de l'antigène Mage-3. Plus particulièrement, l'adénovirus porte la séquence SEQ ID n°2 codant pour un fragment portant le nonapeptide antigénique de Mage-3. L'adénovirus construit est un adénovirus de sérotype 5, possédant une délétion dans les régions E1 et E3, l'acide nucléique d'intérêt étant inséré dans la région E1, au niveau de la délétion.

L'acide nucléique inséré au niveau de la région E1 comprend plus particulièrement :

- le promoteur SR α . Le promoteur SR α comprend l'origine de réplication précoce de SV40 et une partie du LTR du HTLV1 (correspondant au domaine R et à une partie de U5), suivis de la jonction d'épissage 16S de SV40 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 466).
- un minigène MAGE-3 de 44 pb (SEQ ID N° 2). Ce fragment a été obtenu par PCR à partir du gène Mage-3 complet. Il comporte un ATG en position 12, un codon stop en position 44 et la séquence correspondant au nonapeptide (27pb) qui est présenté par la molécule HLA.A1 aux lymphocytes T cytotoxiques. (Cf figure 2).
- le site de polyadénylation du virus SV40.

Cet acide nucléique a été extrait du plasmide pcD-SR α -MAGE-3, correspondant au plasmide pcD-SR α dans lequel le minigène Mage-3 a été cloné au site EcoRI. L'insert obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pAd.RSV- β Gal, à la place du fragment comportant le LTR de RSV et le gène LacZ (Figure 3).

Le plasmide pAd-SR α -MAGE-3 ainsi obtenu a ensuite été utilisé pour produire l'adénovirus recombinant. Pour cela, les cellules de la lignée 293 ont été co-transfectées par le plasmide pAd-SR α -MAGE-3 et par l'ADN de l'adénovirus mutant dl324 en présence de phosphate de calcium. Les adénovirus recombinants produits ont ensuite été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est

amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'analyse de l'ADN viral par digestion à l'aide d'enzymes de restriction EcoRI démontre la présence de l'insert dans le génome. L'adénovirus peut être conservé à - 80°C dans 20 % de glycérol.

10

Exemple 4 : Caractérisation fonctionnelle des adénovirus de l'invention

Cet exemple démontre que les virus selon l'invention sont capables d'induire l'expression du gène d'intérêt codant pour une protéine dont la dégradation conduit à l'expression d'un peptide antigénique à la surface des cellules cibles.

L'expression du minigène MAGE-1 et la présentation du peptide ont été mises en évidence sur des cellules infectées par l'Ad-Mage (4.1.), par détermination de la lyse spécifique (4.2.) et stimulation de la production de TNF (4.3.).

20

4.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires qui ont été infectées sont les suivantes :

25 - C1R.A1 : lignée lymphocytaire B transformée par l'EBV (réf. Storkus, W.J., Howell, D. N., Salter, R. D., Dawson, J. R., and Cresswell, P. : NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. J. Immunol. 138 : 1675 - 1659, 1987) et transfectée par le gène HLA.A1 cloné dans le plasmide pHEBO.

30 - Gerl III β E⁻F⁻ : Cellules de mélanome humain HLA.A1 immunosélectionnées pour la perte de l'antigène MAGE-1. (désignées Gerlach E dans les tableaux 1 et 2).

Ces deux lignées expriment donc la molécule HLA.A1 mais pas l'antigène MAGE-1.

35

4.2. Détermination de la lyse spécifique

Cet exemple démontre l'existence d'une lyse spécifique des cellules par un clone de CTL spécifique de l'antigène (test de relargage du chrome radioactif). Pour cela, les cellules mentionnées en 4.1. ont été infectées par l'adénovirus Ad-Mage1 (exemple 2) ou par un adénovirus contrôle (Ad- β Gal) à une multiplicité d'infection de 500 pfu/cellule. Les cellules infectées ont ensuite été marquées au chrome 51 puis incubées pendant 4 heures, à raison de 1000 cellules / puits, avec le CTL spécifique (clone 82:30) à différents rapports cellules effectrices/cellules cibles (E/T). Le pourcentage de lyse a ensuite été déterminé. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1. Ils montrent clairement que les cellules infectées par les virus selon l'invention présentent une sensibilité à la lyse par les CTL spécifiques nettement supérieure à celle des cellules infectées par l'adénovirus contrôle. Ces cellules présentent également une sensibilité nettement accrue par rapport aux cellules directement transfectées par l'antigène Mage-1, ce qui démontre l'efficacité thérapeutique des vecteurs de l'invention.

Ces résultats montrent donc clairement que les virus de l'invention sont capables de conférer à des cellules une sensibilité importante à la lyse par les CTL spécifiques.

4.3. Stimulation de la production de TNF

Dans cet exemple, la capacité des cellules Gerl III β E-F⁻ à stimuler la production de TNF par le même clone de CTL a été évaluée. Pour cela, les cellules Gerl III β E-F⁻ ont été infectées par l'adénovirus Ad-Mage1 (exemple 2) ou par un adénovirus contrôle (Ad- β Gal) à une multiplicité d'infection de 50 ou 100 pfu/cellule, puis incubées avec le clone CTL. Après 24 heures, la quantité de TNF présente dans les surnageants a été mesurée par détermination de leur cytotoxicité sur une lignée sensible au TNF (lignée WEHI-164-13). La viabilité cellulaire a été mesurée au moyen d'un test colorimétrique (MTT). Les résultats sont exprimés en densité optique puis en quantité de TNF (pg/ml). Ce test n'a pas été effectué sur les cellules C1R.A1 car elles sécrètent naturellement du TNF. Les cellules contrôles Gerlach E⁺ sont des cellules de mélanome exprimant Mage - 1 et HLA - A1.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2. Ils montrent clairement que les cellules infectées par les virus selon l'invention induisent une production de TNF par les CTL, ce qui confirme sans ambiguïté les propriétés biologiques et thérapeutiques des virus de l'invention.

5

Exemple 5 : Activité in vivo des virus PIA de l'invention

L'exemple 4 a montré que, in vitro ou ex vivo, les cellules infectées par un adénovirus selon l'invention sont bien reconnues en test TNF et lysées en
10 test de relargage de chrome radioactif par un CTL spécifique.

Cet exemple démontre maintenant que in vivo, les adénovirus selon l'invention sont capables de générer une réponse CTL spécifique. Plus particulièrement, cet exemple démontre que 2 injections à une semaine d'intervalle de 10^9 particules virales (pfu) dans les souris DBA/2 génèrent
15 chez une partie d'entre elles une forte réponse CTL spécifique.

Deux séries d'expériences ont été réalisées. Les plans de ces deux séries sont présentés sur les figures 4 et 5. Dans la première série d'expériences (voir plan figure 4), les particules virales ont été administrées pour moitié dans la cavité péritonéale et pour l'autre moitié sous la peau (en 4
20 sites). Dans la deuxième série d'expériences (voir plan figure 5), les particules virales ont été administrées par injections sous-cutanées, intra-péritonéales, intra-nasales et intra-trachéales. Ces deux séries d'expériences ont été réalisées selon le protocole suivant. Les souris ont été sacrifiées 15 jours après la seconde série d'injections de l'adénovirus. Les splénocytes de
25 ces souris ont ensuite été mis en présence de l'antigène P815A au moyen de cellules L1210A+ (leucémie syngénique transfectée avec le gène P₁A du mastocytome P815) irradiées pour une période de 8 jours. Au terme de cette culture mixte tumeur-lymphocytes (MLTC), les lymphocytes dirigés contre l'antigène P815A ont proliféré et se sont différenciés en lymphocytes T
30 tueurs. Ceux-ci sont alors mis en présence de cellules marquées avec du chrome radioactif. Il s'agit de cellules P511, un variant azaguanine - résistant du mastocytome de souris P815 portant l'antigène A et de Pl.204, un variant de ce même mastocytome ayant perdu l'antigène A. Ce dernier sert de contrôle négatif. Afin d'éliminer toute possibilité de réaction non spécifique,
35 les cellules cibles marquées avec du chrome radioactif sont également mises

en présence de cellules syngéniques (L1210) portant à leur surface les antigènes de la cellule stimulante dans la MLTC à l'exception de l'antigène A de P815.

5 Les résultats obtenus avec la première série d'expérience, exprimés en pourcentage de lyse spécifiques sont présentés dans les tableaux 3A et 3B.

Les résultats obtenus avec la deuxième série d'expérience, exprimés en pourcentage de lyse spécifiques, sont présentés dans les tableaux 4A et 4B.

10 Dans les deux cas, les résultats présentés montrent, souris par souris, des niveaux de lyse proportionnels aux rapports effecteurs/cibles (moyennes de duplicats). Des CTL ont été obtenus quel que soit le site d'injection de l'adénovirus (Tableau 4A + B). Ces résultats montrent clairement que les
15 adénovirus de l'invention sont capables de générer in vivo une immunité contre les cellules porteuses de l'antigène tumoral.

Tableau 1

	E/T ratio	CLR		CLR		CLR		Gerlach E-		Gerlach E-	
		infected	Ad Mage-1	infected	Ad β gal	transfected	with Mage-1	infected	Ad Mage-1	infected	Ad β gal
spontaneous maximum spont/max	30	62		3		33		15			0
	10	59		2		40		15			0
	3	61		4		45		13			0
	1	44		3		30		6			0
	0.3	44		1		25		5			0
	0.1	28		2		19		2			2
	100 μ l	143		173		209		860			1049
% of blue cells pfu/c	supernatant	1563		1958		1618		8320			7334
		9 %		9 %		13 %		10 %			14 %
		500		500				500			500

Tableau 2

P82:30

Anti-Mage-1 CTL clone

+CTL

-CTL

pfu/cell

Gerlach

Gerlach E+	(HLA A1+) (Mage 1+)	1.049 = 0 pg TNF	0.17 = 45 pg TNF
Gerlach E-	(HLA A1+) (Mage 1-)	1.082 = 0 pg TNF	0.995 = 0 pg TNF
	infected with Ad. β gal		
Gerlach E-	(HLA A1+) (Mage 1-)	1.045 = 0 pg TNF	0.98 = 0 pg TNF
	infected with Ad. β gal		
Gerlach E-	(HLA A1+) (Mage 1-)	1.015 = 0 pg TNF	0.58 = 4 pg TNF
	infected with Ad. Mage 1		
Gerlach E-	(HLA A1+) (Mage 1-)	1.028 = 0 pg TNF	0.355 = 12 pg TNF
	infected with Ad. Mage 1		
Medium		1.102 = 0 pg TNF	
CTL P82:30			1.086 = 0 pg TNF

* of blue cells

Gerlach : 40 to 50 % with 50 pfu and 60 to 70 % with 100 pfu

Tableau 3A

1° : 1 souris injectées avec l'adénovirus recombinant

P1A

	effector/ target	PS11	Pl. 204	L1210A+ + cold L1210 (50 cold targets per labelled target)	L1210 + cold L1210	L1210A+	L1210
Mouse No.1	218 71 24 8 3 1	14 6 5 2 4 2	10 0 0 0 2 0	4 3 0 0 0 0	0 2 0 0 0 0	15 7 6 3 0 6	21 13 1 11 5 0
Mouse No.2	325 108 36 12 37 4 1	77 83 69 59 37 14	44 36 24 14 3 0	100 78 56 29 3 0	30 0 1 0 4 0	96 96 78 47 23 8	74 65 50 35 20 19
Mouse No.3	250 83 28 9 3 1	76 63 42 25 14 2	34 34 23 8 1 0	64 41 13 1 0 0	10 8 5 0 0 0	81 88 59 13 6 1	92 65 54 24 1 8
Mouse No.4	550 183 61 20 7 2	66 55 41 25 12 6	45 40 28 7 7 2	77 42 22 7 0 1	25 20 2 1 0 0	85 74 47 27 22 5	66 41 40 43 16 6

MTD/GN

5A94

2° : souris injectées avec l'adénovirus recombinant

Bgal

24

Tableau 3B

	effector/ target	P511	Pl.204	L1210A+ + cold L1210	L1210 + cold L1210	L1210A+ L1210	L1210
Mouse No.1	375 125 42 14 5 2	1 5 3 4 2 0	2 5 0 0 1 0	2 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 0	11 6 1 1 0 0	20 2 6 3 1 1
Mouse No.2	463 154 51 17 6 2	11 6 5 2 2 3	0 0 3 0 0 0	10 0 0 0 1 0	0 0 0 0 2 0	12 10 2 3 2 0	14 0 1 7 0 5
Mouse No.3	438 146 49 16 5 2	4 7 0 2 0 2	0 2 0 0 0 0	0 0 5 0 0 0	0 0 0 0 0 0	8 1 0 3 0 0	12 11 7 4 1 0
Mouse No.4	488 163 54 18 6 2	6 8 6 1 4 2	2 1 0 0 0 0	2 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0	13 0 2 3 2 0	4 0 11 0 4 6
spontaneous maximum spont/max	236 1722 14	194 1170 16		140 786 10	116 547 21	125 790 16	95 449 21

5A94

Tableau 4A

	Effector/ target	P511	P1.204	P511 + cold L1210 50><1 ratio	P1.204 + cold L1210 50><1 ratio
Subcutaneous					
Mouse No.1	490	9	2	0	1
	163	5	3	0	0
	54	3	1	0	0
	18	3	0	0	0
	8	2	1	0	0
	2	0	0	0	0
Mouse No.2	50	5	0	0	1
	27	3	0	0	0
	9	5	0	3	0
	3	6	0	0	0
	1	4	0	1	0
	0.3	2	0	0	0
Mouse No.3	300	73	18	68	0
	100	71	15	72	0
	33	92	10	75	1
	11	73	8	57	8
	4	56	3	25	0
	1	25	2	8	0
Intra-peritoneal					
Mouse No.1	258	51	9	48	0
	85	43	10	37	0
	28	43	8	27	0
	9	38	3	12	1
	3	18	2	8	0
	1	7	0	1	0
Mouse No.2	295	9	4	9	2
	88	8	6	2	0
	33	7	4	2	0
	11	3	2	1	0
	4	1	2	0	0
	1	0	0	0	1
Mouse No.3	400	68	12	76	0
	133	77	12	82	0
	44	88	14	73	0
	15	14	7	66	0
	6	10	6	30	0
	3	10	1	14	0
Mouse No.4	185	8	2	3	0
	52	3	0	3	0
	57	10	2	3	0
	8	4	1	2	0
	2	3	0	0	0
	0.8	2	0	2	0

Tableau 4A(suite)

	Effector/ target	P511	P1.204	P511 + cold L1210 50><1 ratio	P1.204 + cold L1210 50><1 ratio
Intratracheal					
Mouse No.1	440	67	11	50	3
	147	78	13	52	2
	49	64	6	49	0
	18	34	8	23	0
	6	31	7	9	0
	2	14	0	2	0
Mouse No.2	410	8	7	3	2
	137	6	7	3	1
	45	6	4	0	1
	15	5	2	2	0
	9	1	3	0	0
	2	1	2	0	2
Mouse No.3	344	8	2	3	1
	115	4	0	2	0
	38	8	0	1	0
	13	8	0	0	0
	4	4	1	0	0
	1	1	0	0	0
Mouse No.4	265	80	9	52	0
	85	46	8	47	0
	28	42	7	21	0
	9	33	3	9	0
	3	17	2	2	0
	1	5	2	1	0
Mouse No.5	230	2	0	1	0
	77	4	0	3	0
	25	2	0	0	0
	8	2	0	0	0
	3	1	1	0	0
	1	1	2	0	0
Mouse No.6	210	13	2	11	0
	70	10	0	7	0
	23	6	0	2	1
	3	1	0	0	0
	3	2	0	0	0
	1	2	0	0	0
Intranasal					
Mouse No.1	430	58	0	52	6
	160	52	0	58	1
	53	84	4	65	0
	18	84	2	52	0
	6	51	2	33	0
	2	52	0	20	0
Mouse No.2	205	4	0	0	2
	69	4	0	0	0
	83	1	0	0	0
	8	5	0	0	0
	2	3	0	0	0
	0.8	2	0	0	0

Tableau 4A(suite)

	Effector/ target	P511	P1.204	P511 + cold L1210 50><1 ratio	P1.204 + cold L1210 50><1 ratio
Intranasal					
Mouse No.3	250	1	0	0	0
	83	0	0	0	0
	28	1	0	0	0
	9	1	0	0	0
	3	1	0	0	0
	1	1	0	0	0
Mouse No.4	280	2	0	1	0
	87	8	1	0	0
	29	1	0	0	0
	10	2	0	1	0
	3	0	0	0	0
	1	1	1	0	0
Mouse No.5	240	3	0	0	2
	80	1	0	0	0
	27	1	0	0	1
	9	1	1	0	0
	3	1	0	0	0
	1	1	1	1	0
Mouse No. 6	125	0	0	0	0
	42	0	0	0	0
	14	0	0	0	0
	5	1	0	0	0
	2	0	0	0	1
	0.6	0	0	0	0

Tableau 4B

2°: Adβgal injected mice					
	Effector/ target	P511	Pl.204	P511 + cold L1210 50><1 ratio	Pl.204 + cold L1210 50><1 ratio
Sub- cutaneous	Mouse	300	0	0	0
	No.1	100	0	0	0
		33	0	0	0
		11	0	0	0
		4	0	0	1
		1	0	0	0
	Mouse	230	4	3	1
	No.2	77	1	1	0
		25	1	4	0
		8	0	0	0
		3	0	0	0
		1	0	0	0
Intra- peritoneal	Mouse	220	1	2	1
	No.1	73	0	0	0
		24	1	1	2
		8	0	0	0
		3	0	0	1
		1	0	0	0
	Mouse	410	9	1	3
	No.2	137	1	1	2
		45	0	0	0
		15	0	1	0
		5	0	1	0
		2	0	0	0
Intra- tracheal	Mouse	310	0	0	0
	No.1	103	0	0	0
		34	0	0	0
		11	0	0	0
		4	0	0	0
		1	0	0	0
	Mouse	270	2	1	1
	No.2	90	1	0	0
		30	0	0	0
		10	0	0	0
		3	1	0	0
		1	1	0	0
Intranasal	Mouse	400	0	0	0
	No.1	18	1	0	1
		5	0	0	0
		2	0	0	0
	Mouse	230	3	0	1
	No.2	77	2	0	0
		25	0	0	0
		9	0	0	0
		3	1	0	0
		1	0	0	0
spontaneous			106	127	122
maximum			1041	971	957
spont/max			10 %	13 %	13 %
					110
					988
					12 %

LISTE DE SEQUENCESSEO ID N°1

5

TTGAATTCGC CGCCATGGAG TCCTTGCAGC TGGTCTTTGG CATTGACGTG
AAGGAAGCAG ACCCCACCGG CCACTCCTAT GTCCTTGTC A CCTGCCTAGG
TCTCTCCTAT GATGGCTAGA ATTCTT

10

SEO ID N°2

AATTCGCCGC CATGGAAGTG GACCCCATCG GCCACTTGTA CTAG

SEO ID N°3

15

AATTCGCCGC CATGCTGCCT TATCTAGGGT GGCTGGTCTT CTAG

REVENDICATIONS

- 5 1. Adénovirus recombinant défectif contenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour une protéine ou un peptide spécifique de tumeur.
2. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique codant pour une protéine ou un peptide spécifique de tumeur humaine.
- 10 3. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'acide nucléique inséré dans son génome code pour tout ou partie d'un antigène spécifique d'un mélanome.
- 15 4. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un acide nucléique codant pour un fragment d'un antigène spécifique d'un mélanome humain comprenant la partie présentée aux CTL en association avec les molécules du CMH-I.
5. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour une protéine ou un peptide en dérivant, sélectionnée parmi les protéines Mage -1, Mage-3, Bage, Rage et Gage.
- 20 6. Adénovirus recombinant défectif comprenant inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour un peptide de la protéine Mage-1 ou Mage-3 comprenant la partie présentée aux CTL.
7. Adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, la séquence SEQ ID n° 1.
- 25 8. Adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, la séquence comprise entre les résidus 55 à 82 de la séquence SEQ ID n°1.
9. Adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, la séquence SEQ ID n° 2.

10. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les sérotypes humains Ad2 et Ad5.

11. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les sérotypes canins.

5 12. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comporte une délétion dans la région E1.

13. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une délétion dans la région E4.

10 14. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'acide nucléique est inséré dans la région E1 ou E3 ou E4.

15 15. Composition pharmaceutique comprenant au moins un adénovirus selon l'une des revendications précédentes.

16. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la production in vitro ou ex vivo de lymphocytes cytotoxiques spécifiques de tumeurs humaines.

20 17. Composition comprenant des cellules infectées par un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 14.

25 18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules présentatrices d'antigènes (APC) infectées par un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 14.

30 19. Procédé de préparation de cellules T cytotoxiques spécifiques d'un antigène tumoral comprenant la mise en contact de précurseur de cellules CTL avec une population de cellules infectées par un virus selon l'une des revendications 1 à 14.

ORIGINAL

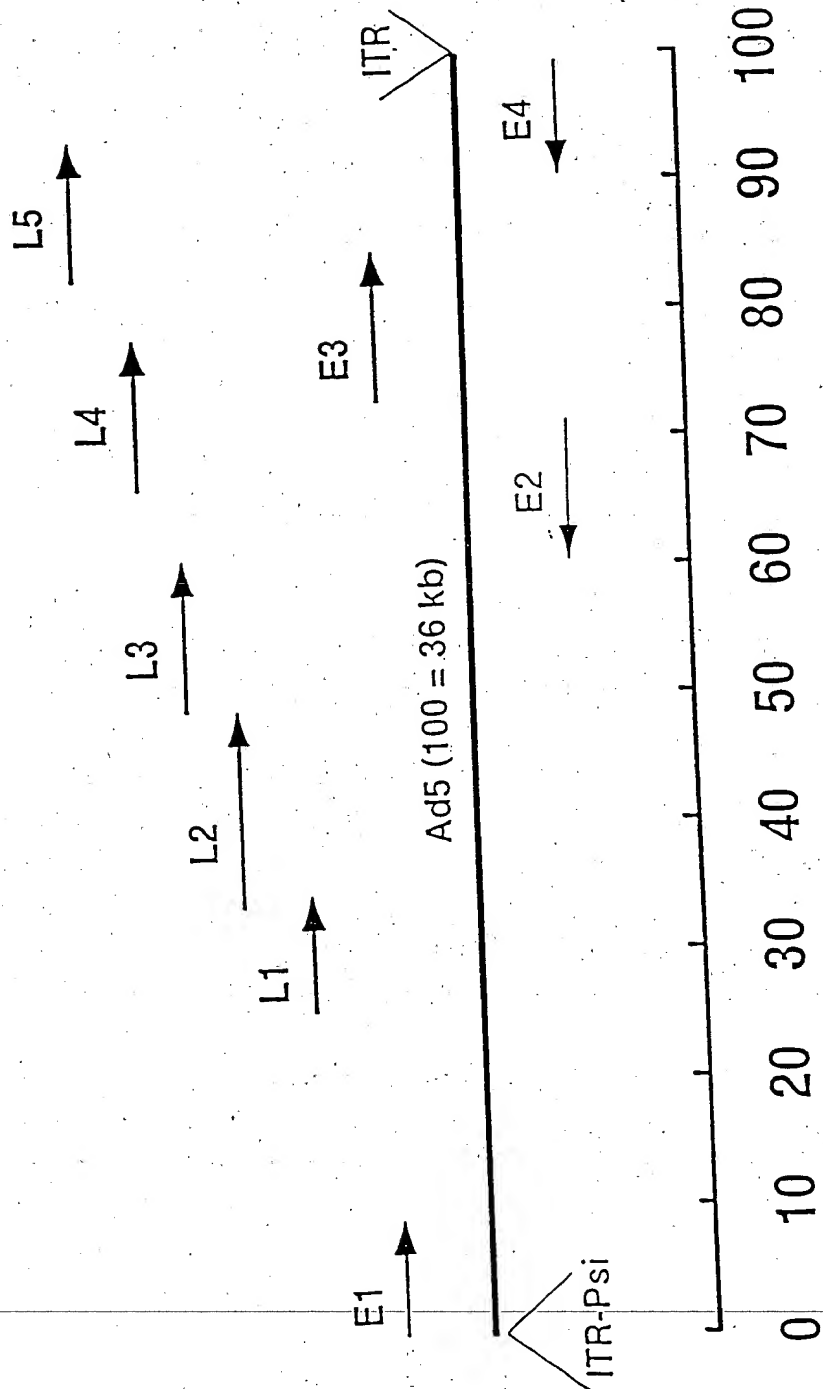


Figure 1

ORIGINAL

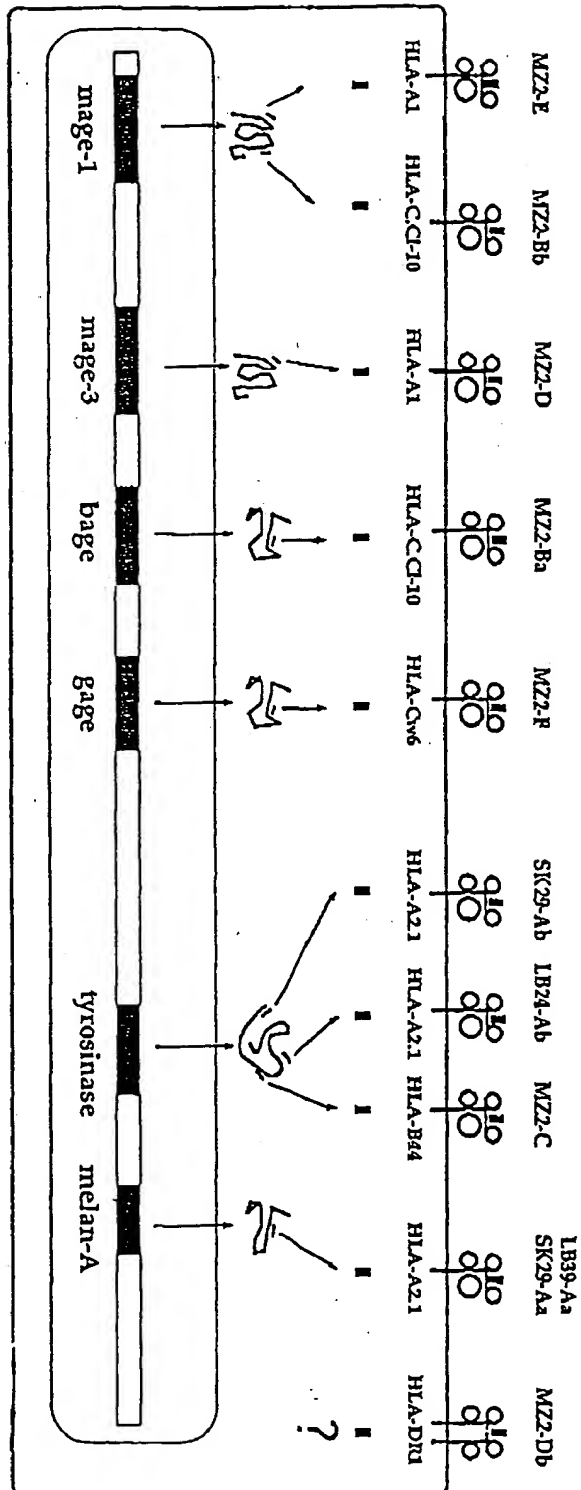


Figure 2

ORIGINAL

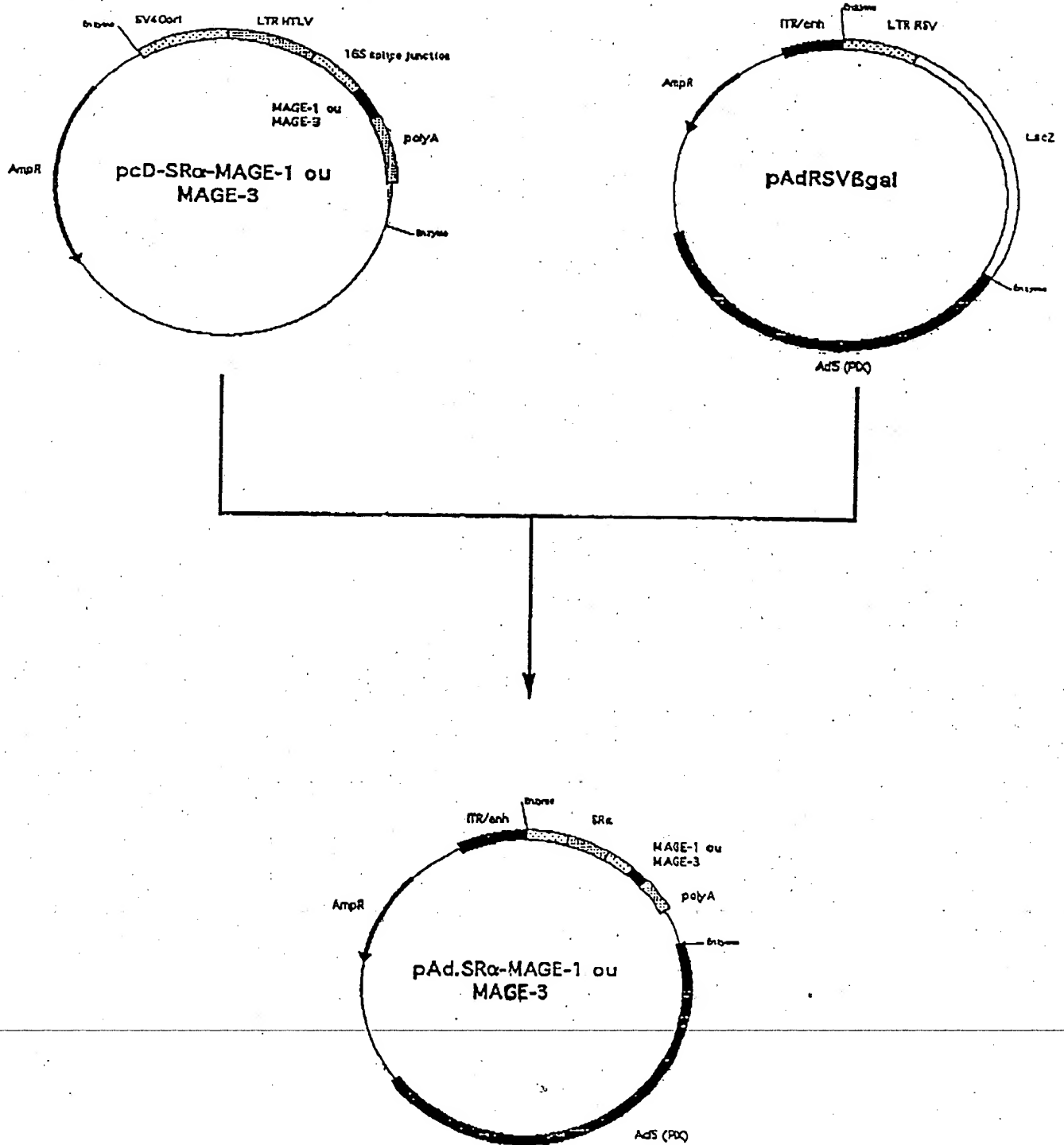


Figure 3

ORIGINAL

Immunisation de souris DBA/2 par les adenovirus recombinants P1A ou lac z.

IMMUNISATION	STIMULATION	TEST	RESULTATS
<p><u>Adenovirus P1A</u></p> <p>1.10-9 particules virales 50% répartis en 4 sites s-c. et 50% en ip.</p> <p>2 groupes de 4 F D2 12 s. J0</p> <p>4 F</p> <p>Idem</p> <p>J7</p>	MLTC	<p>Pour les souris Injectées 1 fois. P511 P1.204.</p>	<p><i>Souris Injectées</i> 1 X avec P1A. 0 / 4.</p>
<p><u>Adenovirus βgal</u></p> <p>2 groupes de 4 F D2 12 s. J0</p> <p>4 F</p> <p>Idem</p> <p>J7</p>	<p>5.10-6 spc. 2.10-5 L1210A+ Irr. dans milieu MLC.</p> <p>J14 ou 21</p>	<p>Pour les souris Injectées 2 fois. P511 P1.204 et L1210 A+ L1210 avec ou sans compétition froide (L1210).</p> <p>J21 ou 28</p>	<p><i>Souris Injectées</i> 2 X avec P1A. 3 / 4 montrent une réponse spécifiquement dirigée contre P1A.</p>

Figure 4

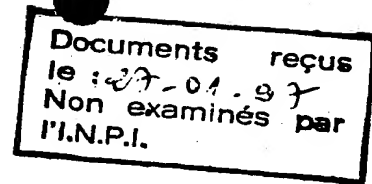
ORIGINAL

DBA/2 mice immunized with P1A (Batch n°3) or β gal recombinant adenoviruses

Routes of injections.		10 ⁹ pfu per injection.		IMMUNIZATION	STIMULATION	TEST	RESULTS
1° : Ad.P1A							
Intra-nasally		6F12w	20µl	20µl			1/6
Intra-tracheally		6F12w	50µl	50µl	MLTC	P511 P1.204 and P511 P1.204 with or without cold competition (L1210 at a 50><1 ratio)	2/6
IP		4F12w	100µl	100µl	5.10 ⁶ spc.+ 2.10 ⁵ irr. L1210A+ in MLC medium..		2/4
SC		4F12w	100µl	100µl			1/3
2° : Ad.βgal					REM : Mediastinal lymph nodes of IN and IT mice and peritoneocytes of IP injected mice are stimulated with L1210 A+ (2.10 ⁵ c). (1 to 2.10 ⁶ effector cells in each well) ↓ NOLYSIS		0/2
IN		3F12w	20µl	20µl			0/2
IT		3F12w	50µl	50µl			0/2
IP		3F12w	100µl	100µl			0/2
SC		3F12w	100µl	100µl			0/2

REVENDEICATIONS

- 5 1. Adénovirus recombinant défectif contenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour une protéine ou un peptide spécifique de tumeur, capable d'induire une protection immunitaire et une destruction par le système immunitaire des cellules tumorales correspondantes.
- 10 2. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique codant pour une protéine ou un peptide spécifique de tumeur humaine.
3. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'acide nucléique inséré dans son génome code pour tout ou partie d'un antigène spécifique d'un mélanome.
- 15 4. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un acide nucléique codant pour un fragment d'un antigène spécifique d'un mélanome humain comprenant la partie présentée aux CTL en association avec les molécules du CMH-I.
- 20 5. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'acide nucléique code pour une protéine ou un peptide en dérivant, sélectionnée parmi les protéines Mage -1, Mage-3, Bage, Rage et Gage.
6. Adénovirus recombinant défectif comprenant inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour un peptide de la protéine Mage-1 ou Mage-3 comprenant la partie présentée aux CTL.
- 25 7. Adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, la séquence SEQ ID n° 1.
8. Adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, la séquence comprise entre les résidus 55 à 82 de la séquence SEQ ID n°1.



9. Adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, la séquence SEQ ID n° 2.
10. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les sérotypes humains Ad2 et Ad5.
- 5 11. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les sérotypes canins.
12. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comporte une délétion dans la région E1.
- 10 13. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une délétion dans la région E4.
14. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'acide nucléique est inséré dans la région E1 ou E3 ou E4.
- 15 15. Composition pharmaceutique comprenant au moins un adénovirus selon l'une des revendications précédentes.
- 20 16. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la production in vitro ou ex vivo de lymphocytes cytotoxiques spécifiques de tumeurs humaines.
17. Composition comprenant des cellules infectées par un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 14.
- 25 18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules présentatrices d'antigènes (APC) infectées par un adénovirus recombinant défectif selon l'une des revendications 1 à 14.
- 30 19. Procédé de préparation de cellules T cytotoxiques spécifiques d'un antigène tumoral comprenant la mise en contact de précurseur de cellules CTL avec une population de cellules infectées par un virus selon l'une des revendications 1 à 14.